

PCT/JP2004/005087

日 本 国 特 許 庁
JAPAN PATENT OFFICE

08. 4. 2004

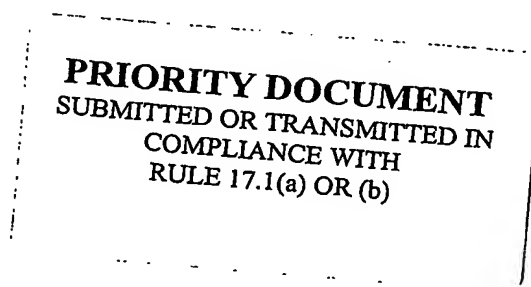
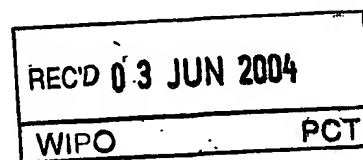
別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日 2 0 0 3 年 4 月 8 日
Date of Application:

出 願 番 号 特 願 2 0 0 3 - 1 0 4 5 1 5
Application Number:
[ST. 10/C]: [J P 2 0 0 3 - 1 0 4 5 1 5]

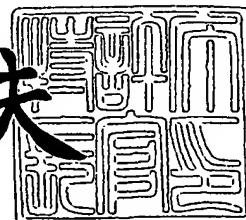
出 願 人 麒麟麦酒株式会社
Applicant(s):



2 0 0 4 年 5 月 2 0 日

特許庁長官
Commissioner,
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号 出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 1 9 8 4

【書類名】 特許願

【整理番号】 14208701

【特記事項】 特許法第30条第1項の規定の適用を受けようとする特許出願

【提出日】 平成15年 4月 8日

【あて先】 特許庁長官殿

【国際特許分類】 A61K 31/00

【発明の名称】 骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物および食品

【請求項の数】 8

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 研究開発部
食品安全センター内

【氏名】 田 ▼じま▲ 修

【発明者】

【住所又は居所】 群馬県高崎市宮原町 3 麒麟麦酒株式会社 研究開発部
食品安全センター内

【氏名】 形 山 幹 生

【特許出願人】

【識別番号】 000253503

【住所又は居所】 東京都中央区新川二丁目 10 番 1 号

【氏名又は名称】 麒麟麦酒株式会社

【代理人】

【識別番号】 100075812

【弁理士】

【氏名又は名称】 吉 武 賢 次

【選任した代理人】

【識別番号】 100091487

【弁理士】

【氏名又は名称】 中 村 行 孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100094640

【弁理士】

【氏名又は名称】 紺 野 昭 男

【選任した代理人】

【識別番号】 100107342

【弁理士】

【氏名又は名称】 横 田 修 孝

【選任した代理人】

【識別番号】 100111730

【弁理士】

【氏名又は名称】 伊 藤 武 泰

【手数料の表示】

【予納台帳番号】 087654

【納付金額】 21,000円

【提出物件の目録】

【物件名】 明細書 1

【物件名】 図面 1

【物件名】 要約書 1

【プルーフの要否】 要

【書類名】 明細書

【発明の名称】 骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物および食品

【特許請求の範囲】

【請求項 1】

イソキサントフモールを有効成分として含んでなる、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物。

【請求項 2】

異性化ホップエキスを有効成分として含んでなる、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物。

【請求項 3】

異性化ホップエキ스가、ホップエキスを異性化して得られた異性化ホップエキスよりも高いイソキサントフモール濃度を有するものである、請求項 2 に記載の骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物。

【請求項 4】

請求項 1～3 のいずれか一項に記載の有効成分を含んでなる、骨粗鬆症の予防、治療または改善用の食品。

【請求項 5】

健康食品、機能性食品、特定保健用食品、または病者用食品である、請求項 4 に記載の食品。

【請求項 6】

飲料の形態である、請求項 4 または 5 に記載の食品。

【請求項 7】

予防、治療または改善上の有効量の請求項 1～3 のいずれか一項に記載の有効成分を、哺乳動物に投与することを含んでなる、骨粗鬆症を予防、治療または改善する方法。

【請求項 8】

骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物を製造するための、請求項 1～3 のいずれか一項に記載の有効成分の使用。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の背景】

発明の分野

本発明は、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物、および骨粗鬆症の予防、治療または改善用の食品に関する。

【0002】

背景技術

骨粗鬆症は、低骨量と骨組織の微細構造の破綻とによって特徴づけられる疾患であり、骨の脆弱性亢進と骨折危険率の増大に結びつく疾患である。骨粗鬆症は世界中で大きな健康問題となっており更年期女性の3人に1人、高齢者の多くが男女とも罹患している。骨粗鬆症による骨折は、我が国において「寝たきり」となる原因の第3位であり、医療費の増加を招く原因の一つにもなる。また、高齢化社会の進展に伴い、その患者数はさらに増加するものと考えられる。このため、骨粗鬆症を予防、治療または改善するための医薬の開発はきわめて重要であるといえる。

【0003】

40歳代以降に徐々に進行する骨量減少の要因は、加齢に伴って腸管からのカルシウム吸収性が低下するためであり、また体内ビタミンD₃量の低下によりカルシウムに関するホメオスタシスを保つために副甲状腺ホルモンの分泌が亢進するためと推定される。中でも女性の場合には、骨形成を促進し、かつ、骨吸収を抑制していた女性ホルモンが更年期に減少し、その結果、急激な骨量減少がもたらされることが多い。

【0004】

現在までのところ、臨床的に使用されている骨粗鬆症治療製剤としては、例えば、ビタミンD製剤、カルシトニン製剤、エストロゲン製剤、イブリフラボン製剤、ビタミンK₂製剤、タンパク同化ステロイド製剤、およびビスホスフォネート製剤が挙げられる。このうちエストロゲン製剤は、閉経後骨粗鬆症の予防または治療に有効であることが知られているが、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生病リスクを上昇させるなど深刻な副作用が伴うことが知られている。

【0005】

薬剤による骨粗鬆症の治療は、長期間にわたることが多く、投与の長期化による副作用の発現など種々の問題が無視できない。このため、現在までのところ、薬剤による骨粗鬆症の治療は、根本的な治療を目的としたものではなく、疾病の進行を抑制するなどの対症療法によるものである。

また、骨粗鬆症に関しては予防的な措置を講じることは極めて重要であると考えられている。しかしながら、薬剤投与による日常的な骨粗鬆症の予防は、経済性、安全性の面から実現されるには至っていない。

したがって、安全性に優れ、日常的に使用可能な骨粗鬆症の予防または治療剤が望まれている。この場合、食経験のある食品から、骨粗鬆症の予防または治療効果のある成分を見出すことは、安全性の面からも望ましいといえる。

【0006】

一方、薬物投与療法以外の骨粗鬆症の予防のためには、カルシウムをはじめとする種々の栄養素の適切な摂取と同時に過剰なアルコール摂取の制限、禁煙、運動などの生活習慣の改善が提言されている。薬物は、生体にとって異物であり、副作用を念頭においた治療が必要であることから、非薬物的な治療法は有効である。中でも、日々摂取する食事による療法は重要であると考えられており、骨粗鬆症の予防、治療または改善に効果のある優れた食品の開発が望まれている。

【0007】

ホップは、ヨーロッパ原産のクワ科多年草（学名：Humulus lupulus）であり、一般的には、その毬果（雌花が成熟したもの）をホップと呼んでいる。ホップは、ビールの苦味、香りづけに用いられることで有名であり、長く人々が摂取してきた。この苦味および香りは、ホップのルプリン部分（毬果の内苞の根元に形成される黄色の顆粒）よりもたらされる。ホップは、民間薬としても用いられており、鎮静効果、入眠および安眠効果、食欲増進、健胃作用、および利尿作用などの生理効果が知られている。

【0008】

ホップ成分であるフムロン類やキサントフモールについては、in vitroの実験によって骨吸収抑制作用を有していることが示されている（特開平7-3305）。

94号公報(特願平7-85405号)(特許文献1)、特開平7-285856号公報(特願平6-82852号)(特許文献2)、および Biosci Biotech Biochem 61(1), 158-159 (1997)(非特許文献1))。また、ビール摂取によって骨密度の減少が抑制され、これがホップ由来の活性であることも報告されている(形山幹生ら、「骨粗鬆症モデルラットにおけるビールの骨密度減少抑制効果」、第56回日本栄養・食糧学会大会 講演要旨集、平成14年6月20日発行、326頁、31-10p(非特許文献2))。

【0009】

ホップにエストロゲン活性があることは以前から知られている(例えばMunch. Med. Wschr. 95, 845 (1953)(非特許文献3))。また1999年になって、ホップから女性ホルモン活性物質として8-プレニルナリンゲニンが単離されている(J. Clinical Endocrinology & Metabolism 83(6), 2249-2252 (1999)(非特許文献4))。したがって、その活性に基づきホップを閉経後骨粗鬆症の予防または治療に利用することも考えられるが、エストロゲン製剤の場合と同様に、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生リスクの上昇という深刻な副作用が問題となる。

【0010】

ホップ成分の異性化物としては、例えばイソフムロン類(イソ α 酸類)、イソキサントフモールが知られている。これらは、ビール製造の過程(麦汁煮沸工程中)において、添加されたホップ成分が異性化されることによってビール中に生じる。因みに、ビール中のイソキサントフモール含有量は、0.04~3.4 mg/Lであるとの報告がある(J. Chromatogr. A 832 (1999) p97-107(非特許文献5))。同様にビール中のイソフムロン類の含有量は、最も含有量の多いと思われるタイプのビール(Foreign Extra Stout: Guinness Malaysisa Berhad 社製:出典 Brauindustrie)で約60 mg/Lであるとの報告がある。

【0011】

イソキサントフモールは、成長因子産生増強作用が知られており、そのような作用に基づく用途向けの、異性化ホップエキスを含有した医薬、または機能性飲食品が提案されている(WO01/76614号パンフレット(特許文献3))

）。

しかしながら、イソキサントフモールの骨粗鬆症改善作用に関しては本発明者らの知る限り、何も知られていない。イソフムロン類は、前記特開平 7-330594 号公報において、フムロン類と併記して有効成分として挙げられているが、ここにはイソフムロン類が骨吸収抑制作用を有するとの具体的証拠は一切示されていない。

【0012】

なお上記記載中で挙げられた文献を列記すると下記の通りである。

【0013】

【特許文献 1】

特開平 7-330594 号公報

【特許文献 2】

特開平 7-285856 号公報

【特許文献 3】

国際公開 WO 01/76614 号パンフレット

【非特許文献 1】

Biosci Biotech Biochem 61(1), 158-159 (1997)

【非特許文献 2】

形山幹生ら、「骨粗鬆症モデルラットにおけるビールの骨密度減少抑制効果」、第 56 回日本栄養・食糧学会大会 講演要旨集（社団法人日本栄養・食糧学会）、平成 14 年 6 月 20 日発行、326 頁、31-10p

【非特許文献 3】

Munch. Med. Wschr. 95, 845 (1953)

【非特許文献 4】

J. Clinical Endocrinology & Metabolism 83(6), 2249-2252 (1999)

【非特許文献 5】

J. Chromatogr. A 832 (1999) p97-107

【0014】

【発明の概要】

本発明者らは、今般、ビール等に含まれる異性化されたホップ由来成分が優れた骨粗鬆症の予防または改善作用を有することを見出した。またこの作用がイソキサントフモールに基づくものであって、イソキサントフモールはその類似化合物であるキサントフモールに比べてより優れた骨粗鬆症の予防または改善作用を有していることを見出した。本発明はこれらの知見に基づくものである。

よって本発明は、骨粗鬆症を予防、治療または改善するために用いられる組成物および食品であって、優れた安全性と活性を有するものの提供をその目的とする。

【0015】

本発明による骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物は、イソキサントフモールを有効成分として含んでなる。

また本発明による骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物は、異性化ホップエキスを有効成分として含んでなる。

本発明による骨粗鬆症の予防、治療または改善用の食品は、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを含んでなるものである。

【0016】

本発明による組成物または食品の有効成分は、長年食品として飲用されてきたビールに含まれているものである。したがって、本発明による組成物または食品は、患者または骨粗鬆症の予防を望む者が長期間にわたって服用または喫食しても副作用がほとんどなく、安全性に優れたものである。よって本発明による組成物または食品は、骨粗鬆症の予防、治療または改善において有利に使用することができる。また、本発明による組成物または食品は、目的とする効果が期待される用量の1000倍以上の用量の場合であってもエストロゲン作用が見られない。このため、本発明によれば、エストロゲン製剤の場合のようなエストロゲン作用を介した深刻な副作用、例えば、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生リスクの上昇を回避しつつ、骨粗鬆症の予防、治療または改善に関する優れた効果を得ることができる。

【0017】

【発明の具体的な説明】

イソキサントフモール

本発明による組成物および食品は、前記したように、有効成分としてイソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを含んでなる。

イソキサントフモールは、市販のキサントフモール（例えば、Apin chemical 社より入手可能）、またはホップより精製される高純度のキサントフモールを、異性化することによって得ることができる。

【0018】

ホップからのキサントフモールの精製は、例えば下記のようにして行うことができる。乾燥ホップをエタノール抽出し、ろ過後ろ液を減圧濃縮する。次いで、得られた濃縮物に、ヘキサンと85%エタノール水溶液を用いた液-液分配処理を行って、エタノール水溶液層を分取し、この層を減圧下で濃縮する。得られた濃縮物をクロロホルム：ヘキサン（5：2）に溶解させ、シリカゲル系カラムに通して、得られる画分の内から、キサントフモール溶出画分を分取する。分取された画分の溶出液を減圧濃縮し、ヘキサンおよび酢酸エチルを用いた再結晶法を繰り返すことによって、精製キサントフモールを得ることができる。

キサントフモールの異性化は、キサントフモールを、アルカリまたは酸化マグネシウムの存在下において加熱するか、またはその他の公知の方法にキサントフモールを付すことによって行うことができる。

【0019】

異性化ホップエキス

異性化ホップエキスは、基本的には、ホップのルプリン部に由来する抽出物（ホップエキス）を得、これを積極的に異性化することによって得ることができる。

【0020】

ホップ抽出物は、例えば毬花やその圧縮物をそのままもしくは粉碎した後、抽出操作に供することによって、調製することができる。

抽出操作としては、例えば、ビール醸造に用いられるホップエキスの調製法として用いられる、エタノール溶媒による抽出法や超臨界二酸化炭素抽出法などが挙げられる。また該抽出操作としては、その他一般に用いられるホップ抽出法を

採用してもよい。例えば、(1) 溶媒中にホップの毬花、その粉碎物などを冷浸、温浸等によって浸漬する方法；(2) 加温し攪拌しながら抽出を行い、濾過して抽出液を得る方法；または(3) パーコレーション法等も、前記抽出操作において適用することができる。

【0021】

これら抽出操作によって得られた抽出液は、必要に応じて、ろ過または遠心分離に付すことによって固形物を除去することができる。得られた液は、これをそのままホップ抽出物として用いてもよいが、そこに含まれる溶媒を留去して一部を濃縮または乾燥させた後、用いてもよい。また、濃縮または乾燥後に得られた抽出物は、さらに非溶解性溶媒を用いて洗浄して精製してもよく、またこれをさらに適当な溶剤に溶解もしくは懸濁させてもよい。さらに本発明においては、得られた抽出液を、減圧乾燥、凍結乾燥等の慣用の手段によって、ホップ抽出エキスを乾燥物として、これを使用してもよい。

【0022】

前記抽出において用いられる溶媒としては、例えば、水、メタノール、エタノール、プロパノールおよびブタノール等の炭素数1～4の低級アルコール；酢酸エチルエステル等の低級アルキルエステル；エチレングリコール、ブチレングリコール、プロピレングリコール、グリセリンなどのグリコール類；エチルエーテル、アセトン、酢酸等の極性溶媒；ベンゼンやヘキサン等の炭化水素；エチルエーテルや石油エーテルなどのエーテル類等の非極性溶媒の公知の有機溶媒が挙げられる。これら溶媒は、2種以上を組み合わせ使用してもよい。

【0023】

本発明の好ましい態様によれば、エタノール、水などの溶媒を用いてキサントフモールを含む抽出液を得、該抽出液を超臨界二酸化炭素抽出法に付して、そこに含まれる α 酸、および β 酸画分を除去することによって、キサントフモールをより多く含むホップエキスを得ることができる。この場合、必要に応じて、前記ホップエキスから不溶物をろ過によって除去したり、減圧等により濃縮して溶媒を乾固させてもよい。

【0024】

このようにして得られたホップエキスは、キサントフモールに加えその異性化物であるイソキサントフモールを極少量含む場合もありこれを本発明において使用することも可能であるが、通常は、このホップエキスを異性化することによって、異性化ホップエキスを得、これを本発明において使用する。

【0025】

ホップエキスの異性化は、ホップエキスを、アルカリまたは酸化マグネシウムの存在下において加熱するか、またはその他の公知の方法にホップエキスを付すことによって行うことができる。これにより、ホップエキス中のキサントフモールはイソキサントフモールに変換される。

【0026】

本発明においては、このような状態の異性化ホップエキスを組成物または食品の製造において直接使用しても良いが、好ましくは、その中の有効成分をさらに高濃度で含有する分画物を入手してこれを使用する。

したがって本発明の好ましい態様によれば、本発明による組成物または食品の有効成分として使用する異性化ホップエキスは、ホップエキスを異性化して得られた異性化ホップエキスよりも高いイソキサントフモール濃度を有するものである。

【0027】

本発明においては、種々の方法で抽出された市販のホップエキスを入手して、これを異性化して異性化ホップエキスとして使用してもよいが、添加物として市販されている異性化ホップエキスを入手してこれをそのまま使用してもよい。

【0028】

また前記したイソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキスは、ホップより抽出されたホップエキスを異性化して得られる通常の異性化ホップエキスを、慣用の方法にしたがって、濃縮したり、イソキサントフモールを添加したり、またはイソキサントフモール以外の成分を除去したりすることによって、容易に得ることができる。

また例えば、ホップ毬花粉砕物をエタノール抽出した後、超臨界点炭酸抽出法により分画し、キサントフモール含有量を高めたホップエキス（例えば、Xantho

humol-enriched hop product (商品名)、Hopsteiner社より入手可能)、および、キサントフモールが約80%含まれる製品(Xantho-pure (商品名)、Hopsteiner社より入手可能)が市販のホップエキスとして存在する。これらを異性化することによって、イソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキスを製造することができる。

なお、これらのエキスより、さらに有効成分を高濃度に含有する分画物を前記等の方法も含めて濃縮して得ることができることは言うまでもない。

【0029】

本発明のより好ましい態様によれば、本発明による組成物または食品の有効成分として使用する異性化ホップエキスは、イソキサントフモールを、0.005~90重量%含有してなるものであり、さらに好ましくは、8~90重量%含有してなるものである。

【0030】

また、食品に使用する場合で、食品に加熱工程等キサントフモールが異性化される工程がある場合には、前述したホップエキス、好ましくは通常のホップエキスに比べてキサントフモール含有量を高めたホップエキスを、食品の当該工程前に加えることにより、最終製品中にイソキサントフモールを含有させてもよい。このような食品の代表的な例として、ビール、発泡酒等を挙げることができる。ビール、発泡酒では、麦汁煮沸工程で上記ホップエキスを添加することにより、最終製品中にイソキサントフモールを含有させることができ、キサントフモール含有量を高めたホップエキスをこのような形で使用すれば、ビールの苦味成分であるイソフムロン類の濃度を必要以上に高めることなく(すなわち過度の苦味を与えることなく)、イソキサントフモールを高濃度に含有した製品を製造できる。もちろんこのような異性化工程がある場合でも、前述のように、精製イソキサントフモール、或いは、キサントフモール含有量を高めたホップエキス(例、Xanthohumol-enriched hop product (商品名)、Hopsteiner社より入手可能)さらにキサントフモールが約80%含まれる製品(Xantho-pure (商品名)、Hopsteiner社より入手可能)等を異性化したイソキサントフモールを高濃度に含む異性化ホップエキスを、製造工程或いは最終製品に添加する態様を除外するものでは

ない。

【0031】

用途

卵巣摘出した動物およびヒトにおいては、破骨細胞の活性化、および骨吸収の増加が認められる。しかしながら、通常、女性ホルモンを加えることによりこれらに伴う骨量の減少は見られなくなる。

このような作用がどのようにして発現するかはまだ明らかではないが、骨吸収に関与するサイトカイン IL1、IL6、TGF β 、プロスタグランジンEなどが複雑に関与していると考えられている。また、女性ホルモンの欠乏によって、骨吸収が亢進することに加え、小腸からのカルシウム吸収が抑制されることも骨量減少の原因と考えられる。

【0032】

さらに、女性ホルモンは核内レセプターと結合することによってその活性を発現するが、近年、 α 、 β の2つのタイプのレセプターが存在することが明らかとなっている。近年、ある器官には女性ホルモンとして作用するが、別の組織に対しては拮抗的に作用する薬剤 (SERM) の開発が進んでおり、副作用の少ない薬剤として期待が寄せられている。このように器官によって作用が異なるメカニズムを2種類のレセプタータイプから説明することが検討されている。

以上のような背景から、閉経性の骨粗鬆症の発症メカニズムは複雑多岐にわたり、いまだ解明されていない部分も多く、エストロゲンアゴニスト活性のみから閉経後骨粗鬆症の予防、治療の有効性を説明するのは限界がある。事実、わが国においては、その副作用からエストロゲンアゴニスト活性がない製剤が主として臨床的に使用されている。

【0033】

後記する卵巣摘出ラットを用いた実施例に示すように、イソキサントフモールは、卵巣からのエストロゲン分泌が遮断されることによる骨密度低下を有意に改善させた。このことから、イソキサントフモールは、破骨細胞に直接的または間接的に作用して骨吸収を抑制している可能性が推測される。またイソキサントフモールは、卵巣摘出ラットにおいて認められた骨密度減少改善作用が発現する1

000倍以上の投与量においても、子宮肥大作用が認められなかった（後述する実施例参照）。このことから、イソキサントフモールは、女性ホルモンである 17β エストラジオールとは異なる機構によって作用している可能性も推測される。

したがって、従来のエストロゲン製剤による薬物療法の場合には、不正出血、乳がんや子宮ガンの発生リスクの上昇などの副作用が懸念されるのに対して、本発明による有効成分を用いた場合には、前記副作用を回避しつつ、骨粗鬆症を予防、治療、または改善することができる。

【0034】

したがって、本発明による組成物または食品は、骨密度減少の予防または改善を目的として使用することができる。本発明による組成物または食品は、骨粗鬆症の予防、治療または改善に用いることができる。

【0035】

本発明によれば、予防、治療または改善上の有効量のイソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを、哺乳動物に投与することを含んでなる、骨粗鬆症を予防、治療または改善する方法が提供される。ここで「有効量」は、後述するようなイソキサントフモールの投与量にしたがって選択することができる。

本発明の別の態様によれば、骨粗鬆症の予防、治療または改善用組成物を製造するための、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスの使用が提供される。

【0036】

組成物および食品

本発明による組成物は、イソキサントフモールまたは異性化ホップエキスを有効成分として含んでなるものである。

ここで「有効成分として含んでなる」とは、所望する剤型に応じた薬学上許容されうる担体を含んでいてもよいことは当然として、併用可能な他の薬剤を含有する場合も包含する意味である。

【0037】

本発明による組成物は、経口投与または非経口投与することができる。経口剤

としては、顆粒剤、散剤、錠剤（糖衣錠を含む）、丸剤、カプセル剤、シロップ剤、乳剤、懸濁剤が挙げられる。非経口剤としては、注射剤（例えば、皮下注射剤、静脈内注射剤、筋肉内注射剤、腹腔内注射剤）、点滴剤、外用剤（例えば、経鼻投与製剤、経皮製剤、軟膏剤）、坐剤（例えば、直腸坐剤、膣坐剤）が挙げられる。これらの製剤は、当分野で通常行われている手法により、薬学上許容されうる担体とともに製剤化することができる。

【0038】

薬学上許容されうる担体としては、賦形剤、結合剤、希釈剤、添加剤、香料、緩衝剤、増粘剤、着色剤、安定剤、乳化剤、分散剤、懸濁化剤、防腐剤等が挙げられ、例えば、炭酸マグネシウム、ステアリン酸マグネシウム、タルク、砂糖、ラクトース、ペクチン、デキストリン、澱粉、ゼラチン、トラガント、メチルセルロース、ナトリウムカルボキシメチルセルロース、低融点ワックス、カカオバター等を担体として使用することができる。

併用可能な他の薬剤としては、例えば、アミノ酸、抗生物質、ビタミンD製剤、カルシトニン製剤、エストロゲン製剤、イブリフラボン製剤、ビタミンK₂製剤、タンパク同化ステロイド製剤、およびビスホスフォネート製剤などが挙げられる。

【0039】

製剤は、例えば下記のようにして製造することができる。

経口剤は、例えば賦形剤（例えば、乳糖、白糖、デンプン、マンニトール）、崩壊剤（例えば、炭酸カルシウム、カルボキシメチルセルロースカルシウム）、結合剤（例えば、 α 化デンプン、アラビアゴム、カルボキシメチルセルロース、ポリビニールピロリドン、ヒドロキシプロピルセルロース）、または滑沢剤（例えば、タルク、ステアリン酸マグネシウム、ポリエチレングリコール6000）を有効成分に添加して圧縮成形し、次いで必要により、味のマスキング、腸溶性もしくは持続性の目的のため自体公知の方法でコーティングすることにより製造することができる。コーティング剤としては、例えばエチルセルロース、ヒドロキシメチルセルロース、ポリオキシエチレングリコール、セルロースアセテートフタレート、ヒドロキシプロピルメチルセルロースフタレートおよびオイドラギ

ット（ローム社製、ドイツ、メタアクリル酸・アクリル酸共重合物）などを用いることができる。

【0040】

注射剤は、有効成分を分散剤（例えば、ツイーン(Tween) 80（アトラスパウダー社（米国）製）、HCO60（日光ケミカルズ製）、ポリエチレングリコール、カルボキシメチルセルロース、アルギン酸ナトリウムなど）、保存剤（例えば、メチルパラベン、プロピルパラベン、ベンジルアルコール、クロロブタノール、フェノール）、等張化剤（例えば、塩化ナトリウム、グリセリン、ソルビトール、ブドウ糖、転化糖）などと共に、水性溶剤（例えば、蒸留水、生理的食塩水、リンゲル液等）または油性溶剤（例えば、オリーブ油、ゴマ油、綿実油、コーン油などの植物油、プロピレングリコール）などに溶解、懸濁または乳化することにより製造することができる。この際、所望により溶解補助剤（例えば、サリチル酸ナトリウム、酢酸ナトリウム）、安定剤（例えば、ヒト血清アルブミン）、無痛化剤（例えば、塩化ベンザルコニウム、塩酸プロカイン）等の添加物を添加してもよい。

【0041】

外用剤は、有効成分を固状、半固状または液状の組成物とすることにより製造することができる。例えば、上記固状の組成物は、有効成分をそのまま、または賦形剤（例えば、ラクトース、マンニトール、デンプン、微結晶セルロース、白糖）、増粘剤（例えば、天然ガム類、セルロース誘導体、アクリル酸重合体）などを添加して混合し、粉状とすることにより製造できる。上記液状の組成物は、注射剤の場合とほとんど同様にして製造できる。半固状の組成物は、水性もしくは油性のゲル剤、または軟骨状のものがよい。また、これらの組成物は、いずれも pH 調節剤（例えば、炭酸、リン酸、クエン酸、塩酸、水酸化ナトリウム）、防腐剤（例えば、パラオキシ安息香酸エステル類、クロロブタノール、塩化ベンザルコニウム）などをさらに含んでもよい。

【0042】

坐剤は、有効成分を油性または水性の固状、半固状または液状の組成物とすることにより製造できる。この場合、油性または水性基剤を使用することができる。

。該組成物に用いる油性基剤としては、高級脂肪酸のグリセリド（例えば、カカオ脂、ウイテプゾル類（ダイナマイトノーベル社製））、中級脂肪酸（例えば、ミグリオール類（ダイナマイトノーベル社製））、または植物油（例えば、ゴマ油、大豆油、綿実油）が挙げられる。水性基剤としては、ポリエチレングリコール類、プロピレングリコールが挙げられる。また、水性ゲル基剤としては、天然ガム類、セルロース誘導体、ビニール重合体、アクリル酸重合体が挙げられる。

【0043】

本発明による食品は、本発明による有効成分を有効量含有した飲食品である。

ここで「有効成分を有効量含有した」とは、個々の飲食品において通常喫食される量を摂取した場合に、後述するような範囲で有効成分が摂取されるような含有量をいう。本発明による食品には、本発明による有効成分をそのまままたは上記のような組成物の形態で、食品に配合することができる。より具体的には、本発明による食品は、本発明による有効成分または前述するホップの粉碎物もしくは抽出物をそのまままたは異性化して、飲食品として調製したもの、各種タンパク質、糖類、脂肪、微量元素、ビタミン類等をさらに配合して調製したもの、液状、半液体状もしくは固体状にしたもの、一般の飲食品へ添加したものであってもよい。

【0044】

本発明において「食品」とは、健康食品、機能性食品、特定保健用食品、病者用食品を含む意味で用いられる。さらに「食品」は、ヒト以外の哺乳動物を対象として使用される場合には、飼料を含む意味で用いることができる。

【0045】

また「食品」の形態は特に限定されるものではなく、例えば、飲料の形態であってもよい。

【0046】

本発明による有効成分は、骨量減少抑制作用を有するため、日常摂取する食品やサプリメントとして摂取する健康食品や機能性食品、好適には、カルシウム、マグネシウム等のミネラル類、ビタミンK等のビタミン類を1種以上含有する食品等に本発明の有効成分を配合することによって、骨粗鬆症の発症の予防、治療

および改善、並びに骨粗鬆症予備群の骨粗鬆症への移行防止といった機能を併せ持つ食品を提供することができる。

よって、本発明による食品は、骨密度を高めることもしくはその低下防止を希望する消費者に適した食品、または、骨の健康が気になる消費者に適した食品、すなわち所謂、特定保健用食品、として提供することができる。

【0047】

かかる食品として具体的には、飯類、麺類、パン類およびパスタ類等炭水化物含有飲食品；クッキーやケーキなどの洋菓子類、饅頭や羊羹等の和菓子類、キャンディー類、ガム類、ヨーグルトやプリンなどの冷菓や氷菓などの各種菓子類；ジュース、清涼飲料水、乳飲料、ノンアルコールビール等の各種飲料；ビール、発泡酒等のアルコール飲料；卵を用いた加工品、魚介類（イカ、タコ、貝、ウナギなど）や畜肉（レバー等の臓物を含む）の加工品（珍味類を含む）などを例示することができるが、これらに特に制限されない。

【0048】

本発明による有効成分またはホップの粉碎物もしくは抽出物を異性化したものを、一般食品の原料に添加配合して食品として加工して用いる場合は、後述するように、有効成分もしくはホップの苦みが飲食品の味に影響しない範囲で用いるか、または苦味がマスクされるような工夫をすることが好ましい。

【0049】

また、ビール、ノンアルコールビール、発泡酒などのようなホップ由来の飲食品には、一般的に、本発明における有効成分が既に一定量以上含まれていることがある。すなわち、このような公知のイソキサントフモール含有食品は、単にホップ成分を添加したものでなく、ホップ成分が異性化される工程を経て製造された食品である。このような食品の場合、これらをそのまま本発明による食品として使用することができるが、さらに、これら飲食品に、イソキサントフモールもしくはそれを含むエキス、または異性化ホップエキスを配合することによって、所望の効果をさらに増強することができ、または有効摂取量を低減させることができる。

【0050】

公知のイソキサントフモール含有食品の例であるビール中におけるイソキサントフモール含有量は、前記したように例えば0.04～3.4 mg/Lであるが、ビール中には、その苦味成分であるイソフムロン類やエストロゲン活性を有する8-プレニルナリンゲニンも含有されている。例えば、ビール中における8-プレニルナリンゲニンの含有量は、イソキサントフモール含有量の6分の1～133分の1と広い幅があることが知られている (J. Chromatogr. A 832, 97-107 1999)。

【0051】

本発明が食品である場合には、精製したイソキサントフモールを用いるよりはホップエキスを異性化させた形で用いることがコスト的な問題からは有利であると考えられる。しかしながら、イソキサントフモールと8-プレニルナリンゲニンとの量比が小さい場合は、8-プレニルナリンゲニンのエストロゲン活性に基づく副作用の問題が生じる恐れがある。

したがって、異性化ホップエキスを使用する場合には、副作用問題を回避するためには、前述した様に成人1人1日あたりイソキサントフモールを0.6 mg～300 mgの範囲で摂取するような量を、通常喫食可能な食品の量を考慮して食品中に含有させることが望ましい。この範囲であれば、ホップに含まれる8-プレニルナリンゲニンの副作用が現れないと考えられる。

【0052】

また、食品中に異性化ホップエキスを使用する場合には、イソフムロン類等により生ずる苦味による官能的な点も考慮することが望ましい。この場合、キサントフモール含有量を高めたホップエキスまたはイソキサントフモール含有量を高めた異性化ホップエキスをを用いて、イソキサントフモールに対するイソフムロン類の食品中における含有量を相対的に低くすることが好ましい。あるいは、苦味成分をマスクした上で、ホップ、ホップエキス、または異性化ホップエキスの添加量を増加させてもよい。

【0053】

なお、食品においても、コスト的な問題が無いのであれば、精製イソキサントフモールを食品の製造工程または最終製品中に添加してもよいし、または、製造

工程中に異性化反応をもたらす工程がある場合には該工程前に精製キサントフェールを添加しておいてもよい。

【0054】

本発明による組成物または食品は、人類が飲食品として長年摂取してきたホップ抽出成分またはその誘導物であることから、毒性も低く、哺乳動物（例えば、ヒト、マウス、ラット、ウサギ、イヌ、ネコ、ウシ、ウマ、ブタ、サル等）に対し安全に用いられる。

【0055】

本発明による組成物を骨粗鬆症の予防、治療または改善を目的として用いる場合、その投与量は、受容者、受容者の年齢および体重、症状、投与時間、剤形、投与方法、薬剤の組み合わせ等に依存して決定できる。例えば、本発明による有効成分を医薬として経口投与する場合、成人一人あたり、 $0.01 \sim 100 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、好ましくは $0.02 \sim 50 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、非経口的に摂取する場合は $0.005 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重、好ましくは $0.01 \sim 10 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重の範囲で1日1回または数回の投与単位に分割して投与することができる。

【0056】

異性化ホップエキスを有効成分として用いた場合には、成人一人あたりの摂取量が、イソキサントフェール量として $0.01 \sim 5 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重・日（成人1人1日あたり $0.6 \text{ mg} \sim 300 \text{ mg}$ の範囲の摂取量）、好ましくは $0.02 \sim 1 \text{ mg} / \text{kg}$ 体重・日となるように投与することができる。この範囲であれば、通常の異性化ホップエキスをを用いても、当該エキス中に存在する8-プレニルナリンゲニンのエストロゲン活性の作用発現量以下となり、通常、エストロゲン活性による副作用リスクは問題とならない。

【0057】

【実施例】

本発明を以下の実施例によって詳細に説明するが、本発明はこれらに限定されるものではない。

【0058】

参考例： イソキサントフェールの精製

ビール（麒麟ラガービール（商品名）、麒麟ビール株式会社製）（以下において「ビール」と略す）、およびキサントフモールを多く含む粉末状のホップエキス（Xanthohumol Enriched Product（商品名）、Hopsteiner社製）からのイソキサントフモールの精製例を以下に示す。

【0059】

ビールからの精製

ビール1000mlを脱気し、その800mlを1000mlのジエチルエーテルを用いて抽出した。ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。その後、酢酸エチル20mlを加え、再度、無水硫酸ナトリウムで脱水し、約1mlまで減圧濃縮した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー（Kieselgel60, 10g）を用いて分画した。カラムは30%酢酸エチル／*n*-ヘキサンを用いて洗浄した後、60%酢酸エチル／*n*-ヘキサンを用いて溶出した。溶出画分を減圧乾固し、メタノール3mlに溶解させ、さらに蒸留水3mlを加え、これをHPLCによりさらに精製した。HPLCの条件は下記の通りであった：

移動層： 45%アセトニトリル、および55%蒸留水、

カラム： YMC-ODS-AQ 25×250mm（YMC社製）、

ガードカラム： YMC-ODS-AQ 25×50mm（YMC社製）、

流速： 10ml／分、注入量3ml、

検出器波長： UV290nm。

【0060】

精製されたイソキサントフモールの純度を、HPLC分析および核磁気共鳴（NMR）スペクトル測定によって確認した。純度確認のためのHPLCの条件は、下記の通りであった：

移動層： A液（アセトニトリル）、B液（蒸留水）、およびA液20%～100%によるグラジエント溶出、

カラム： YMC-hydrosphere C18 4.6×250mm（YMC社製）、

流速： 1ml／分、注入量5μl、

検出器波長： UV290nm。

このHPLC分析によって、イソキサントフモールの純度が98%以上であることが確認された。

【0061】

精製されたイソキサントフモール1mgを800mlの重メタノールに溶解し、核磁気共鳴(NMR)スペクトル装置(JNM-A400(日本電子社製))を用いて¹H-NMR測定を行った。

このNMR測定によって、単離精製されたイソキサントフモールの化学シフトは文献で報告されている値と一致し、単一組成であることが確認された。

【0062】

ホップエキスからの精製

ホップエキス1gを水1Lに加え、これをオートクレーブにて100℃で120分間煮沸して、異性化した。室温に冷ました後、上清をろ紙を用いてろ過して、ろ液を得た。次いで、ろ液800mlを1000mlのジエチルエーテルを用いて抽出した。ジエチルエーテル層を無水硫酸ナトリウムで脱水し、減圧濃縮した。その後、酢酸エチル20mlを加え、再度、無水硫酸ナトリウムで脱水し、約1mlまで減圧濃縮した。これをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Kieselgel60, 10g)を用いて分画した。カラムは30%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて洗浄した後、60%酢酸エチル/n-ヘキサンを用いて溶出した。溶出画分を減圧乾固し、メタノール3mlに溶解させ、さらに蒸留水3mlを加え、これをHPLCによりさらに精製した。HPLCの条件は下記の通りであった:

移動層: 45%アセトニトリル、および55%蒸留水、

カラム: YMC-ODS-AQ 25×250mm、

ガードカラム: YMC-ODS-AQ 50×25mm、

流速: 10ml/分、注入量3ml、

検出器波長: UV290nm。

【0063】

精製されたイソキサントフモールの純度を、前記したビールからの精製の場合と同様にして、HPLC分析および核磁気共鳴(NMR)スペクトル測定によっ

て確認した。

HPLC分析によって、イソキサントフォームの純度が98%以上であることが確認された。

NMR測定によって、単離精製されたイソキサントフォームの化学シフトは文献で報告されている値と一致し、単一組成であることが確認された。

【0064】

例1: ビール中のエストロゲン活性成分の特定

1-a) エストロゲン活性の測定法

被検物質のエストロゲン活性を、エストロゲン感受性ヒト乳癌由来MCF-7細胞の細胞増殖を指標として測定した。使用した細胞株は、エストロゲンレセプターを発現しており、エストロゲン様物質の存在下では細胞増殖の亢進が認められるものであった。したがって、この細胞株の細胞増殖をCell Counting Kit (同仁化学研究所製) を用いて測定することによって、エストロゲン活性を測定した。

該Cell Counting KitによるMCF-7細胞の細胞増殖の測定は、細胞内に取り込まれたWST-1試薬 [2-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム, モノナトリウム塩 (2-(4,5-dimethylchiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium, monosodium salt)] から生じるフォルマザンを、マイクロプレートリーダー (SOFTmax (Molecular Devices社製)) を用いて450nmの吸光度を測定することによって行った。

【0065】

より具体的には、Dextran-Coated Charcoal (Sigma社製) に内因性ステロイドを吸着させて除去した牛胎仔血清 (Gibco社製) を10%含み、さらにペニシリンおよびストレプトマイシン (それぞれ10000単位、1mg/ml、Gibco社製)、0.1mM非必須アミノ酸 (Gibco社製)、1mMピルビン酸ナトリウム (Gibco社製)、および、1μg/mlインスリン (ヒト組換え体 27.5USP unit/mg: (Sigma社製)) を含むDMEM培地を用いて、MCF-7細胞を3日間前培養した。このMCF-7細胞の濃度 8×10^4 cells/mlの細胞懸濁液を調製し、これを96ウェルプレート上に100μl/ウェルで播種した。培養1日

後、ジメチルスルホキシドに溶解した被検物質 0.1% (v/v) を含む培地によってウェル内の培地を交換し、さらに培養を続けた。培養 4 日目に再度被検物質を含む新しい培地でウェル内培地を交換し、培養 7 日目に Cell Counting Kit を用いて細胞増殖を測定した。

なお、陽性対照物質としては、最も強力な内因性エストロゲンである 17β -エストラジオール (Sigma 社製) のジメチルスルホキシド溶液を用いた。

【0066】

1-b) ビール中のエストロゲン活性成分の探索

ビールを脱気し、ENV I-18 カラム (10 g、60 ml、Supelco 社製) に供し、20%、50%、80% メタノール水溶液、およびメタノール各 180 ml で順次溶出した。

各画分のエストロゲン活性を前記方法にしたがって測定したところ、80% メタノールおよびメタノールの各溶出画分に活性が確認された。

【0067】

80% メタノール、およびメタノールの各溶出画分を併せて減圧乾固しシリカゲルカラムクロマトグラフィー (Kiesel gel 60, 10g Merck 社製) に供し、*n*-ヘキサン、酢酸エチル：*n*-ヘキサン = 1 : 7、1 : 4 の混合溶媒、酢酸エチルの順に段階的に溶出した。

得られた各画分のエストロゲン活性を測定したところ、酢酸エチル：*n*-ヘキサン = 1 : 7、1 : 4 画分に活性が確認された。

【0068】

これら活性が確認された画分を減圧乾固し、メタノールに溶解して HPLC による分画に供した。HPLC の条件は下記の通りであった：

移動層： A 液 (アセトニトリル)、B 液 (蒸留水)、A 液 40% ~ 100% によるリニアグラジエント溶出、

カラム： YMC-hydrosphere C18 10×250mm (YMC 社製)、

ガードカラム： YMC-hydrosphere C18 10×30mm (YMC 社製)、

流速： 2.5 ml / 分、注入量 80 μ l、

検出器波長： UV 290 nm。

HPLCによって2分間ごとにフラクションを採取し、各フラクションのエストロゲン活性を前記方法にしたがって測定した。

【0069】

結果は下記の通りであった。

保持時間14分～16分において得られたフラクション (Fr 8) と、保持時間18分～20分において得られたフラクション (Fr 10) とにそれぞれエストロゲン活性があることが認められた。

【0070】

この内、Fr 8に含まれる物質の質量 (MS) スペクトル測定を、質量分析計 (DX303 日本電子社製) を用いてEI-MSの手法にしたがって行なったところ、 m/z 354にイオンが観測された。これはイソキサントフモールの標準スペクトルパターンと一致するものであった。さらに、Fr 8の5mgを600 μ lの重ジメチルスルホキシドに溶解し、核磁気共鳴 (NMR) スペクトル装置 (UNITY plus 500型 (バリアン社製)) を用いて ^1H -NMR、 ^{13}C -NMR、およびNOESY-1Dの測定を行ったところ、Fr 8の活性成分がイソキサントフモールであることが確認された。

【0071】

またFr 10について、HPLC質量 (MS) スペクトル分析を行った。

分析装置はHPLC (HP1100 (アジレント社製)) にトリプルステージ型質量分析計 (MS/MS) (Quattro Ultima (マイクロマス社製)) を接続して用いた。このときのHPLC条件は下記の通りであった:

移動層: A液 (アセトニトリル)、B液 (蒸留水)、およびA液55%～90%によるリニアグラジエント溶出、

カラム: Capcell Pack C18 2.0×150mm (株式会社資生堂製)、

流速: 0.2ml/分、注入量5 μ l。

また質量分析計の条件は、イオン化をエレクトロスプレーイオン化方式 (ESI-) とし、プリカーサーイオン338.3、プロダクトイオン218.8、Collision電圧80V、Collisionエネルギー20eVとした。

測定の結果、Fr 10には8-プレニルナリンゲニンが高濃度に含まれている

ことが確認された。

【0072】

1-c) ビール中のイソキサントフモールおよび8-プレニルナリングニンの分析

ビール 1 ml を、ジエチルエーテル 5 ml を用いて 2 回抽出して、窒素乾固した。これを、内部標準として 2, 4-ジヒドロカルコンを 40 ppb 含む 50% メタノール水溶液に溶解し、分析試料とした。

分析装置は HPLC (HP1100 (アジレント社製)) にトリプルステージ型質量分析計 (MS/MS) (Quattro Ultima (マイクロマス社製)) を接続して用いた。このときの HPLC 条件は下記の通りであった:

移動層: A 液 (アセトニトリル)、B 液 (蒸留水)、および A 液 55% ~ 90% によるリニアグラジエント溶出、

カラム: Capcell Pack C18 2.0×150mm、

流速: 0.2 ml/分、注入量 5 μ l。

【0073】

質量分析計の条件は、イオン化をエレクトロスプレーイオン化方式 (ESI-) とし、MRM モードにて両化合物を一斉定量分析した。定量イオンおよびイオン化条件は、イソキサントフモールについては、プリカーサーイオン 352.8、プロダクトイオン 232.8、Cone 電圧 80 V、Collision エネルギー 18 eV とした。8-プレニルナリングニンについては、プリカーサーイオン 338.3、プロダクトイオン 218.8、Cone 電圧 80 V、Collision エネルギー 20 eV とした。

分析の結果、試験に用いたビール中のイソキサントフモール濃度は 2.1 mg/L であり、8-プレニルナリングニンの濃度は 43 μ g/L であった。

【0074】

例 2: In vitro におけるエストロゲン活性評価

精製イソキサントフモールおよび化学合成された 8-プレニルナリングニンのエストロゲン活性を、例 1 と同様にして測定した。ただしこのとき、MCF-7 細胞培養用の培地における被検物質の濃度を次のように設定した。

イソキサントフモールは、該培地中の濃度が、 1.0×10^{-5} 、 1.0×10^{-6} 、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-9} 、および $1.0 \times 10^{-10} \text{ mol/L}$ となるように添加した。

8-プレニルナリンゲニンは、該培地中の濃度が、 1.0×10^{-7} 、 1.0×10^{-8} 、 1.0×10^{-9} 、 1.0×10^{-10} 、 1.0×10^{-11} 、および $1.0 \times 10^{-12} \text{ mol/L}$ となるように添加した。

陽性対照としての 17β -エストラジオールは、該培地中の濃度が、 6.3×10^{-11} 、 1.6×10^{-11} 、 3.9×10^{-12} 、 1.0×10^{-12} 、 1.0×10^{-13} 、および $1.0 \times 10^{-14} \text{ mol/L}$ となるように添加した。

【0075】

結果は図1に示される通りであった。

イソキサントフモールおよび8-プレニルナリンゲニンはいずれも、エストロゲン活性を示した。これらの活性をエストラジオールと比較したところ、イソキサントフモールの活性は約 10^{-5} 倍、8-プレニルナリンゲニンは 10^{-2} 倍であった。

【0076】

例3: in vivoにおけるエストロゲン活性評価

3-a) 幼若ラットにおける評価

in vivoにおけるエストロゲン作用について、幼若Wistar系雌性ラットを用いて評価した。

使用したラットは次のようにして準備した。まず、20日齢のWistar系雌性ラット（日本チャールスリバー社より入手可能）を各動物の体重差が平均体重の $\pm 10\%$ 以内となるよう選別後、1群6匹として無作為に群分けし、水およびAIN-76A（日本クレア社製）を自由摂取させ飼育した。

1日間の予備飼育の後、イソキサントフモールまたは8-プレニルナリンゲニンを、1、5、または 25 mg/kg/day で1日1回、3日間、 10 ml/kg の液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。コントロール群としては溶媒（落花生オイル）を同様にして経口投与し、また陽性対照としては 17β -エ

ストラジオールを用い、これを $400 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の量で同様にして経口投与した。最終投与の約 24 時間後にラットから子宮を摘出し、その重量を秤量することによって *in vivo* におけるエストロゲン活性を測定した。

【0077】

結果は図 2 に示される通りであった。

イソキサントフモールは、エストラジオール、または 8-プレニルナリンゲニンとは異なって、*in vivo* エストロゲン活性を有しないか、または極めて微弱な活性を示すに過ぎないことが判明した。

【0078】

3-b) 卵巣摘出ラットにおける評価

9 週齢の雌性 SD 系ラット（日本チャールスリバー社より入手可能）の両側卵巣を摘出し、1 群 6 匹として無作為に群分けし、水および AIN-76A（日本クレア社製）を自由摂取させ飼育した。手術翌日より被検物質を 1 日 1 回、28 日間、 $10 \text{ml}/\text{kg}$ の液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。

イソキサントフモールについては、ビールに含まれる濃度と同等、5 倍、20 倍になるように、イソキサントフモールを 0.8% エタノール水溶液に溶解したものをそれぞれ調製し、これらを用いた。コントロール群、偽手術群には、0.8% エタノール水溶液を同様にして経口投与した。陽性対照としては 17β -エストラジオールを用い、これを $2 \mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の量で皮下投与した。

【0079】

結果は図 3 および図 4 に示される通りであった。

卵巣摘出群（OVX）の子宮重量は偽手術群と比較して有意に低く、イソキサントフモール投与群によっても子宮重量の有意な回復は認められなかった。

【0080】

例 4: 卵巣摘出後骨粗鬆症における骨密度減少に対する改善効果

9 週齢の雌性 SD 系ラットの両側卵巣を摘出し、翌日より被検物質を 1 日 1 回、28 日間、 $10 \text{ml}/\text{kg}$ の液量を経口ゾンデを用いて胃内強制経口投与した。

コントロール群、偽手術群には 0.8% エタノール水溶液を同様にして経口投

与した。陽性対照としては 17β -エストラジオールを用い、これを $400\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$ の量で皮下投与した。

ビール（国産ピルスナービール）は、イソキサントフモールを $2.1\text{mg}/\text{L}$ 含有し、また 8-プレニルナリンゲニンを $43\mu\text{g}/\text{L}$ 含有するものである。ここではこれを一度、凍結乾燥した後に水に溶解することによってエタノールを除去して、これを被検物質として試験に供した。

【0081】

イソキサントフモールについては、ビールに含まれる濃度と同等、5倍、20倍になるように、イソキサントフモールを 0.8% エタノール水溶液に溶解したものをそれぞれ調製し、これらを用いた。

さらに、ビールにおける骨粗鬆症の予防活性に寄与する主要成分を同定するために、さらに以下の被検液を調製して試験に供した：

- ・イソ α 酸を 30% 含むホップエキス (Iso-Extract (Hopsteiner社製)) を 0.8% エタノール水溶液で希釈した希釈液であって、イソ α 酸濃度がビールと同等濃度 ($30\text{mg}/\text{L}$) になるよう調製した液、

- ・8-プレニルナリンゲニンの水希釈液であって、8-プレニルナリンゲニンがビール中に含まれる濃度と同等になるよう希釈した液、および

- ・イソキサントフモールの異性体であるキサントフモール (Apin chemical社製) の水希釈液であって、キサントフモールがビールに含まれるイソキサントフモールと同等濃度 ($2.1\text{mg}/\text{L}$) となるように調製した液。

【0082】

骨密度の測定は、ラットの大腿骨を採取し、遠位骨端部の海綿骨骨密度を p QCT (Peripheral Quantitative computed tomography) 骨密度測定装置 (XCT-960A (ノーランド・ストラテック社製)) を用いて特定することにより行なった。

【0083】

結果は図5および図6に示される通りであった。

卵巣摘出群 (OVX) の大腿骨における海綿骨骨密度は減少していたが、ビールおよびイソキサントフモール投与により有意に改善された。このような改善は

、ビール中のエストロゲン活性寄与率が最も大きいと考えられる 8-プレニルナリンゲニンには認められなかった。また、キサントフモールやイソフムロン類を含むイソ α 酸については、Pit Formation Assayによって骨吸収阻害活性がすでに報告されているが、これらについてもイソキサントフモールのような活性は認められなかった。

【0084】

前記例 3 にもあるように、卵巢摘出ラットにおいては骨密度減少抑制活性を示す用量、および、それよりも 20 倍の用量の場合でも、イソキサントフモールは子宮重量増加作用を示さなかった。また、幼若ラットにおいては骨密度減少抑制効果が認められる用量の 1250 倍の投与量においても子宮重量増加作用は認められなかった。

【図面の簡単な説明】

【図 1】

図は、MCF-7 細胞の増殖を指標として、イソキサントフモールおよび 8-プレニルナリンゲニンのエストロゲン活性を示すグラフである。図中、IXH はイソキサントフモール、8PN は 8-プレニルナリンゲニン、および E2 は 17β -エストラジオールを表す。

【図 2】

図は、幼若ラットに対するイソキサントフモールおよび 8-プレニルナリンゲニンの *in vivo* エストロゲン作用を調べた結果を表すグラフである。図中、IXH はイソキサントフモール、8PN は 8-プレニルナリンゲニン、および E2 は 17β -エストラジオールを表す。また * は $P < 0.05$ および *** は $P < 0.001$ を意味する。

【図 3】

図は、卵巢摘出ラットに対するイソキサントフモール、8-プレニルナリンゲニン、およびビールの *in vivo* エストロゲン作用を調べた結果を表すグラフである。図中、IXH はイソキサントフモール、および 8PN は 8-プレニルナリンゲニンを表す。また *** は $P < 0.001$ を意味する。

【図 4】

図は、卵巢摘出ラットに対するイソキサントフモール、およびビールのin vivoエストロゲン作用を調べた結果を表すグラフである。図中、IXHはイソキサントフモール、およびE2は17 β -エストラジオールを表す。また***はP<0.001を意味する。

【図5】

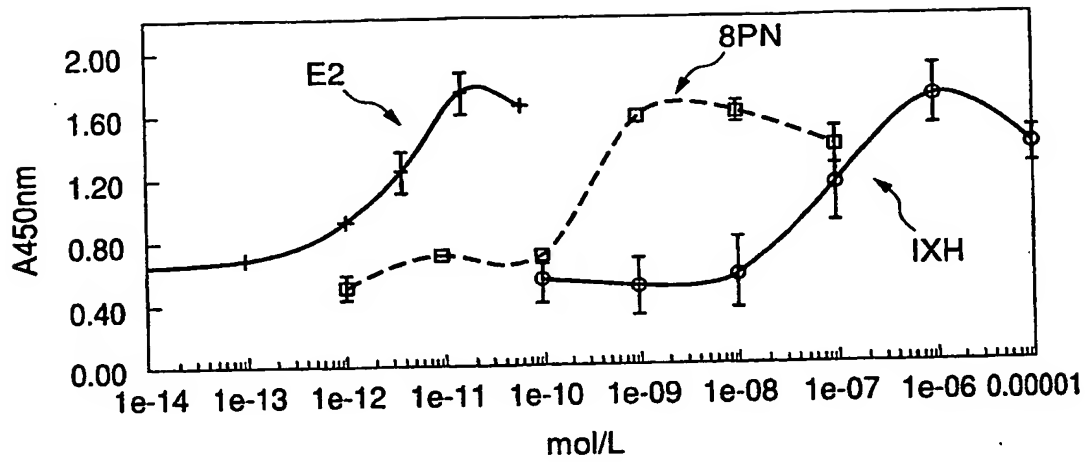
図は、卵巢摘出ラットに対するイソキサントフモール、8-プレニルナリンゲニン、およびビールの骨密度減少抑制作用を調べた結果を表すグラフである。図中、IXHはイソキサントフモール、および8PNは8-プレニルナリンゲニンを表す。また*はP<0.05および***はP<0.001を意味する。

【図6】

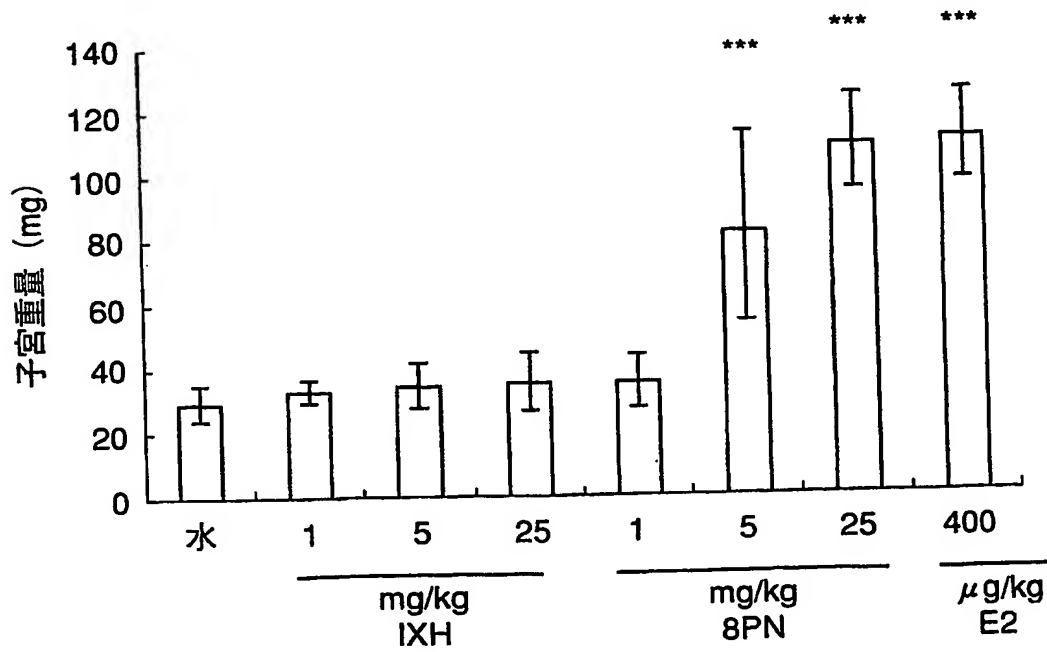
図は、卵巢摘出ラットに対するイソキサントフモール、キサントフモール、イソ α 酸およびビールの骨密度減少抑制作用を調べた結果を表すグラフである。図中、IXHはイソキサントフモール、XNTはキサントフモール、 α はイソ α 酸含有ホップエキス、およびE2は17 β -エストラジオールを表す。また*はP<0.05および***はP<0.001を意味する。

【書類名】 図面

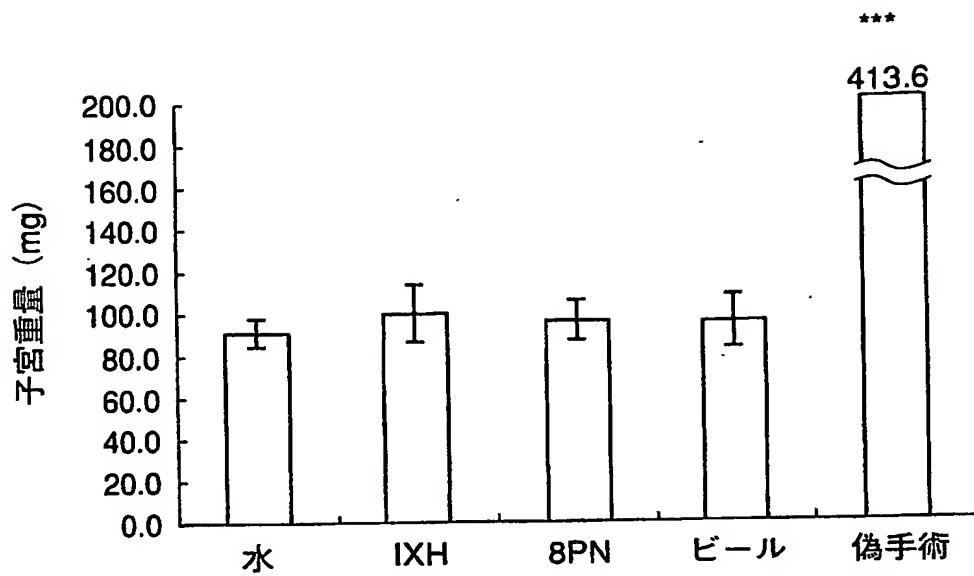
【図1】



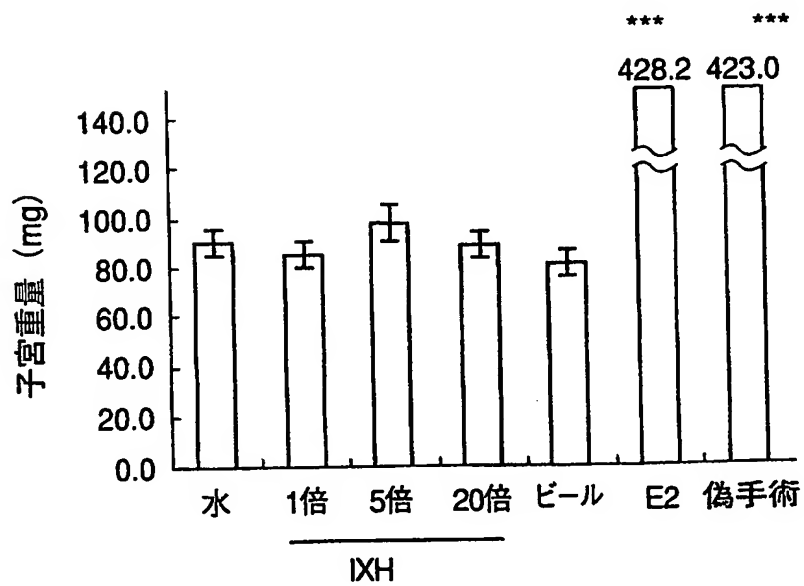
【図2】



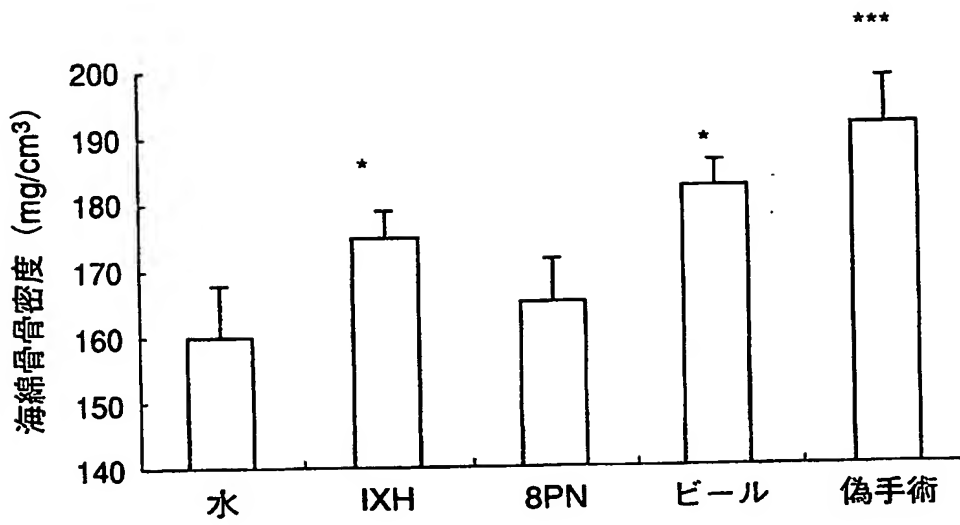
【図 3】



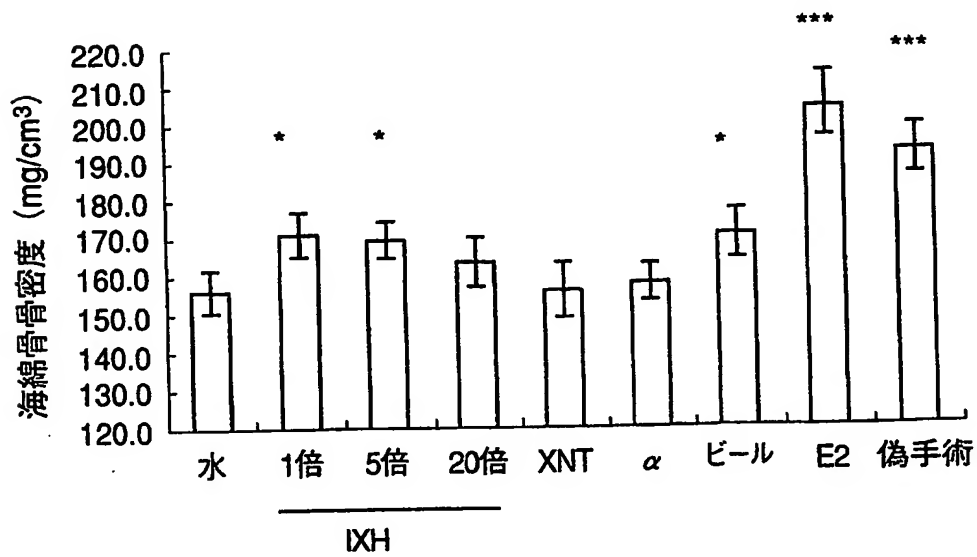
【図 4】



【図 5】



【図 6】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 優れた安全性を有しかつ優れた活性を有する、骨粗鬆症の予防、治療または改善用の医薬または食品を提供すること。

【解決手段】 本発明は、イソキサントフモールもしくは異性化ホップエキスを有効成分として含んでなる、骨粗鬆症の予防、治療もしくは改善用組成物、または食品に関する。本発明によれば、エストロゲン製剤を使用した場合に起こりうる副作用の問題を回避しつつ、骨粗鬆症を予防、治療または改善することができる。

【選択図】 なし

特願 2003-104515

出願人履歴情報

識別番号

[000253503]

1. 変更年月日

1995年 6月14日

[変更理由]

住所変更

住 所

東京都中央区新川二丁目10番1号

氏 名

麒麟麦酒株式会社